



REC'D 11 FEB 2005

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE  
PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1. a) OU b)

Martine PLANCHE

**BEST AVAILABLE COPY**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 010801

Réservé à l'INPI

MISE DES PIÈCES

TE

29 DEC 2003

DU

75 INPI PARIS 34 SP

N° D'ENREGISTREMENT

0315521

ATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

ITE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

29 DEC. 2003

AR L'INPI

os références pour ce dossier

(facultatif) 10019/3

### 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

ARMENGAUD JEUNE  
CABINET LEPEUDRY  
43, rue de la Brèche aux Loups  
75012 PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

### 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*

N°

Date

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Utilisation dans une composition cosmétique ou pharmaceutique d'au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées afin de dépigmenter et/ou éclaircir, de protéger et de régénérer l'épiderme.

### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

N°

Pays ou organisation

Date \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

N°

Pays ou organisation

Date \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale ☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET AMENDEMENTS

Prénoms

Forme juridique

Société Anonyme

N° SIREN

14 35 75 00 39

Code APE-NAF

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Domicile  
ou  
siège

Rue

Zone Industrielle,  
PONTRIEUX

Code postal et ville

12 22 60 PONTRIEUX

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 010801

Réservé à l'INPI

### REMISE DES PIÈCES

DATE 29 DECEMBRE 2003  
LIEU 75 INPI PARIS 34 SP  
N° D'ENREGISTREMENT 0315521  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI  
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI

### Vos références pour ce dossier

(facultatif) 10019/3

### 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

ARMENGAUD JEUNE  
CABINET LEPEUDRY  
43, rue de la Brèche aux Loups  
75012 PARIS

### Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

### 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

☐

ou demande de certificat d'utilité initiale

☐

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

Date

Date

### 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Utilisation dans une composition cosmétique ou pharmaceutique d'au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées afin de dépigmenter et/ou éclaircir de protéger et de régénérer l'épiderme.

### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

SECMA BIOTECHNOLOGIES MARINES

Prénoms

Forme juridique

Société par actions simplifiées

N° SIREN

14 4 0 0 7 5 8 0 2

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

Zone Industrielle de QUEMPEL-GUEZENNEC  
PONTREUX

Code postal et ville

12 2 2 6 0 PONTREUX

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

DÉPÔT DES PIÈCES DATE <b>29 DEC 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0315521</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 @ W / 010801
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		<b>10019/3</b>	
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		<b>ARMENGAUD JEUNE CABINET LEPEUDRY</b>	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	<b>43, rue de la Brèche aux Loups</b>	
	Code postal et ville	<b>75 012 PARIS</b>	
	Pays	<b>FRANCE</b>	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		<b>01 43 44 69 90</b>	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		<b>01 43 42 04 92</b>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</i> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  <b>LE PEUDRY Thérèse - n° 92-1152</b>		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  <b>M. ROCHET</b>	

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE 29 DECEMBRE 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0315521 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		10019/3	
<b>6 MANDATAIRE</b> <i>(s'il y a lieu)</i> Nom _____ Prénom _____ Cabinet ou Société _____ N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____		ARMENGAUD JEUNE CABINET LEPEUDRY	
Adresse	Rue	43, rue de la Brèche aux Loups	
	Code postal et ville	17 15 10 11 12 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i> _____ N° de télécopie <i>(facultatif)</i> _____ Adresse électronique <i>(facultatif)</i> _____		01 43 44 69 90 01 43 42 04 92	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

LEPEUDRY Thérèse - n° 92-1152

L'invention concerne l'utilisation d'au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées dans une composition cosmétique ou pharmaceutique à des fins de dépigmentation et/ou éclaircissement de l'épiderme  
5 accompagné d'un effet protecteur et régénérateur. L'invention a, de plus, pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique comprenant au moins un tel lyophilisat.

10 La peau est une enveloppe protectrice qui représente l'interface entre le milieu extérieur et les autres organes internes. Elle n'est toutefois pas hermétique et, en tant qu'organe d'absorption, elle permet aux substances dissoutes de pénétrer par l'intermédiaire des pores et des follicules pileux.

15 La peau protège contre le froid, la chaleur, le rayonnement ; contre la pression, le frottement ; contre les lésions chimiques ; contre la pénétration des micro-organismes ; de la perte d'eau et de chaleur.

20 La protection naturelle de la peau contre le rayonnement ultraviolet passe par un pigment brun, la mélanine. La mélanine est présente dans des cellules des couches basales de l'épiderme : les mélanocytes. Elle est synthétisée à partir d'un acide aminé, la tyrosine, modifiée par une enzyme, la tyrosinase. La synthèse de la mélanine  
25 est induite par les rayons UV. La coloration foncée de la peau est une première protection naturelle contre le soleil, qui est bien insuffisante pour les peaux les plus claires. Le bronzage est la conséquence, sous l'action des UV, de l'augmentation de l'activité mélanocytaire de synthèse de la  
30 mélanine et du stockage de la mélanine dans les kératinocytes.

La quantité de mélanine et le nombre de mélanocytes sont des facteurs programmés génétiquement qui donnent sa couleur à la peau.

35 Une production excessive et localisée de mélanine provoque l'apparition de taches : taches de rousseur, masque de grossesse, lentigos solaires ou séniles, etc... En effet, selon les dernières nomenclatures, les taches de vieillesse

sont les lentigos séniles et les lentigos solaires sont les autres taches.

Les "taches de vieillesse" sont de petites taches brun pâle, planes et généralement rondes, le plus souvent sur le visage, le dos des mains, le décolleté, les avant-bras. Elles sont provoquées par la combinaison du soleil et du vieillissement. Leur nombre augmente avec l'âge. Sous l'action répétée des rayons UV, les mélanocytes finissent par produire trop de mélanine.

Les lentigines sont des "taches de rousseur" qui ne disparaissent pas en hiver, brunes, minuscules et nombreuses, très proches les unes des autres. On les trouve le plus souvent sur le visage, les épaules et le décolleté. Elles sont provoquées par une overdose d'ultraviolets et peuvent se former dès le plus jeune âge.

Le "masque de grossesse" se manifeste par de grandes taches brunes au contour irrégulier, le plus souvent sur le visage, qui prennent parfois l'aspect d'un masque. Quand ces taches apparaissent au cours de la grossesse, on parle de chloasma, sinon on parle de mélasma. Elles sont provoquées par une stimulation hormonale (grossesse, hormonothérapie) combinée à l'exposition aux rayons UV.

Tous ces types de taches peuvent également être liés au patrimoine génétique et donc à l'hérédité.

Devant l'aspect disgracieux de ces surconcentrations de mélanine, il est d'un intérêt particulièrement important d'avoir accès à des préparations à usage topique qui permettraient de prévenir leur apparition et/ou de les atténuer.

Les fabricants de préparations cosmétiques et pharmaceutiques sont constamment à la recherche de principes actifs non agressifs permettant d'inhiber ou de bloquer la synthèse de la mélanine, directement ou indirectement, ou d'inhiber ou de bloquer le transfert des mélanosomes aux kératinocytes, et donc d'éclaircir ces taches tout en protégeant ces zones d'une pigmentation solaire. De même, les fabricants de préparations cosmétiques cherchent des principes actifs dépigmentants non agressifs devant le désir

croissant des populations noires et asiatiques d'éclaircir leur peau, tout en leur proposant un produit protecteur de la peau.

5 Pour pallier aux désagréments des autres traitements disponibles fastidieux et/ou agressifs (laser, cryothérapie) de dépigmentation, ces principes actifs doivent en même temps protéger la peau et/ou stimuler la régénération des cellules la constituant.

10 En effet, la protection de la peau et/ou la stimulation de la régénération des cellules de la peau permettent de lutter en même temps contre un facteur aggravant des taches : le vieillissement cutané aux multiples causes.

15 La première cause du vieillissement cutané est le vieillissement « programmé » qui peut être accéléré par le stress, le tabagisme et certaines maladies. Avec les années, la peau perd de son élasticité car le derme produit toujours moins de fibres de collagène et d'élastine. D'où l'affaiblissement progressif du tissu conjonctif et le  
20 relâchement de la peau. La capacité de renouvellement de l'épiderme tend également à diminuer, celui-ci devient plus sec et plus mince car son métabolisme est altéré. La peau prend également avec le temps un aspect grisonnant qui donne un teint terne contre lequel un soin éclaircissant peut  
25 aussi lutter.

La deuxième cause du vieillissement est la diminution de la production hormonale qui entraîne la diminution progressive des fonctions tissulaires, cellulaires et organiques. Les hormones telles que l'hormone de croissance  
30 (HGH), la testostérone, la DHEA et la mélatonine sont produites en grandes quantités jusqu'à l'âge de 20 ans et elles favorisent le renouvellement cellulaire.

La conséquence de ces différentes causes du vieillissement conjuguées aux effets de l'environnement  
35 (pollutions diverses : gaz d'échappement, fumées de cigarettes, fumées d'usines, produits chimiques...) amènent à la surproduction de radicaux libres qui ont pour cibles les différents composants de la cellule : protéines,



lipides, sucres et l'ADN et qui constituent ainsi une autre cause du vieillissement cutané. Certaines influences extérieures les poussent à entrer en réaction car ils recherchent constamment d'autres molécules avec lesquelles ils peuvent se lier. Ils attaquent alors les fibres de collagène, les membranes cellulaires et la couche graisseuse de la peau. Ils altèrent le patrimoine génétique des cellules, de sorte que la qualité des nouvelles cellules de la peau diminue.

Le corps se protège contre ces agresseurs par des systèmes enzymatiques s'opposant à ces réactions d'oxydation (antioxydants). Mais dès l'âge de vingt ans, les mécanismes de défense naturels s'affaiblissent progressivement, de sorte que la peau ne peut plus se défendre toute seule.

La Demanderesse a découvert de manière surprenante et inattendue qu'un lyophilisat de cellules végétales dédifférenciées permet d'atteindre cette combinaison d'effets recherchée : il dépigmente et/ou éclaircit l'épiderme avec une parfaite innocuité tout en le protégeant et le régénérant.

Les cellules dédifférenciées conservent toutes les potentialités cellulaires comme les cellules souches. Elles expriment tous les gènes de leur génome donc toutes les protéines qui permettent à chaque type de cellule spécialisée de se protéger du milieu extérieur.

L'invention a donc pour objet premier l'utilisation dans ou pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique d'au moins un lyophilisat de cellules végétales dédifférenciées, ledit lyophilisat permettant de dépigmenter et/ou éclaircir, de protéger et de régénérer l'épiderme.

On entend par "cellule végétale dédifférenciée" toute cellule végétale ne présentant aucun caractère de spécialisation et pouvant régénérer à elle seule un plant entier de végétal dont elle provient. Elle peut être isolée à partir de tout échantillon de plante entière ou d'organe comme les feuilles, les tiges, les racines, les graines, les

fleurs, les pétales, les anthères, les fruits, etc.. appelé explant.

De manière préférée, on utilise un morceau de feuille ou une graine en tant qu'explant.

5        On préfère tout particulièrement cultiver l'explant *in vitro*. On entend par "culture *in vitro*" l'ensemble des techniques de l'art antérieur connues de l'homme du métier qui permettent dans des conditions parfaitement contrôlées de régénérer un organe ou une plante entière à partir d'un  
10 explant cultivé dans ou sur un milieu nutritif défini. Ces conditions parfaitement maîtrisées permettent une parfaite reproductibilité et homogénéité des plants. En particulier, cette méthode de culture fournit des clones identiques à l'infini. Parmi les méthodes et milieux de culture *in vitro*  
15 décrits dans l'art antérieur, on peut citer à titre d'exemples les milieux de Gamborg (1968), de Murashige et Skoog (1962), de Morel (1970), etc..dont la formulation est décrite dans "Plant Culture Media : formulations and uses" de E.F. George, DJM Puttock et H.J. George (Exegetics Ltd  
20 1987).

En particulier, on préfère utiliser des cellules végétales différenciées de végétal halophile comme les espèces *Salicornia ramossissima* (Salicorne), *Sueda vera*, *Beta maritima*, *Obione portulacoides*, *Armeria maritima*, *Crithmum*  
25 *maritimum* (Criste Marine), *Ophrys sphegodes*, *Artemia vulgaris*, *Muscari comosum*, *Eryngium maritimum*, *Sanguisorba minor*, *Cochlearia officinalis*, *Fumaria officinalis*, *Vincetoxicum fullonum*, *Dipsacus fullonum*, *Heracleum spondylium*, *Inula crithmoides*, *Inula britannica*, *Inula*  
30 *viscosa*, tout particulièrement des cellules végétales différenciées de Criste Marine (*Crithmum maritimum*). Les végétaux halophiles, également nommés halophytes, sont des végétaux qui tolèrent des sols riches en sel. Ils ont développé des systèmes de défense contre le milieu extérieur  
35 agressif qu'ils colonisent. En particulier, les halophytes sont des végétaux du bord de mer capables de supporter un sol riche en sel, l'humidité et le vent. Ils luttent en permanence pour maintenir la pression osmotique dans leurs

cellules, l'eau ayant tendance à traverser la membrane plasmique vers le compartiment extracellulaire le plus sodé.

Dans le cas de l'utilisation de végétal halophile, il est particulièrement important de développer une culture in vitro de cellules qui fournit une biomasse infinie et reproductible pour protéger ces espèces, les halophytes étant en danger face à la pollution des mers.

Dans une réalisation particulière de l'invention, il est également possible de modifier certaines conditions de culture (pH, température, composition gazeuse ambiante, composition du milieu de culture, luminosité). Les cellules différenciées tendront alors à produire plus ou moins de certaines substances intracellulaires.

Le second objet de l'invention est une composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans une base physiologiquement acceptable, 0,05 à 2%, de préférence 0,1 à 1%, de manière particulièrement préférée 0,5% d'au moins un lyophilisat tel que décrit précédemment.

En effet, un tel lyophilisat peut être utilisé comme seul principe actif de la composition selon l'invention. Cependant, plusieurs lyophilisats peuvent être ajoutés à la base de la composition selon l'invention.

Dans un premier mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, destinée à rajeunir l'aspect de la peau.

Dans un deuxième mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée au traitement des taches appelées lentigos.

Dans un troisième mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, destinée à éclaircir les peaux noires ou asiatiques.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

#### Légende des Figures

- 5 Figure 1 : morphologie générale, coloration à l'hématoxyline/éosine (HES) sur épiderme reconstitué SKINETHIC® simple (kératinocytes)
- Figure 2 : morphologie générale, coloration à l'hématoxyline/éosine (HES) sur épiderme reconstitué SKINETHIC® intégrant des
- 10 mélanocytes
- Figure 3 : marquage de la filaggrine
- Figure 4 : marquage de KI-67 (évaluation de l'index mitotique)

15

#### Exemple 1: Culture in vitro de cellules dédifférenciées de Criste Marine à partir de tissu végétal:

##### 1- Obtention de cals primaires

On prélève à l'aide de ciseaux des morceaux de tissus dans la zone choisie (3 cm minimums) tige, feuilles...

20 A partir de ce stade de la manipulation, tout doit se dérouler en atmosphère stérile sous une hotte à flux laminaire.

Pour stériliser le matériel végétal, on immerge les tissus 30 s dans l'éthanol puis on élimine le solvant, on les rince par 3 x 100 ml d'H<sub>2</sub>O stérile, on les immerge 15 min. dans l'hypochlorite de sodium additionné de quelques gouttes de Tween 20 et on les rince par 3 x 100 ml d'H<sub>2</sub>O stérile.

30 Pour mettre les tissus en culture, on dépose les fragments de tissus dans une boîte de Pétri stérile (125 mm), on découpe des fragments de tissus (2 à 3 mm) en prenant soin d'éliminer les parties blanchies par l'eau de javel. Les explants ainsi obtenus sont légèrement incisés et déposés à

35 demi-enfoncés dans le milieu nutritif gélosé (Tableau 1).

##### 2- Repiquage des cals

A ce stade de la manipulation, tout doit se dérouler en

atmosphère stérile sous une hotte à flux laminaire.

On prélève au niveau du cal 2 à 3 amas cellulaires (1 à 2 cm) à l'aide d'une spatule,

On dépose et répartit ces amas sur le milieu neuf.

5

Composition du milieu de culture solide : Tableau 1

Macroéléments	mg/l
KNO <sub>3</sub>	2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	300
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	250
Microéléments	mg/l
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,8
Vitamines	mg/l
myo-inositol	100
acide nicotinique	1
D(+)-panthoténate de calcium	1
(+)-biotine	0,01
chlorhydrate de pyridoxal	1
dichlorure de thiamine	1
Composés organiques	g/l
saccharose	30
Phytohormones	mg/l
acide naphtalène acétique	1,5
acide 2,4 dichloro-phénoxyacétique	0,5
kinétine	0,5
Agent gélifiant	g/l
agar	9

### 3- Expansion des cellules du cal en milieu liquide

- Inoculum d'entretien :

Les cellules du cal sont transférées dans un milieu liquide identique au milieu solide sans agar (Tableau 1).

- 5 Elles sont cultivées sous agitation (110 tours/min), à 25°C en lumière blanche continue (3500 lux, tubes fluorescents "lumière du jour") dans des erlenmeyers de 250 mL, à raison de 50 mL par erlenmeyer.

Elles sont diluées tous les 10 à 11 jours au 1/4 c'est-à-dire 100 mL dans 400 mL.

- Production de matière sèche :

- 15 Les cellules sont cultivées à partir d'une dilution au 1/4 de l'inoculum d'entretien dans des erlenmeyers de 5L, à raison de 2L de culture par erlenmeyer, sous agitation (110 tours/min), à 25°C en lumière blanche continue (3500 lux, tubes fluorescents "lumière du jour") et ce pendant 12 à 13 jours.

20 Il faut noter que l'acide 2,4 dichloro-phénoxyacétique est entièrement métabolisé et qu'il ne sera pas retrouvé dans le produit final.

#### Exemple 2 : Préparation d'un lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine :

- 25 La culture cellulaire liquide en suspension est centrifugée pour culoter les cellules.

Les cellules sont passées sur un tamis de 150 à 200 µm, congelées puis lyophilisées dans un lyophilisateur à plaques.

30

#### Exemple 3 : Mise en évidence sur épiderme reconstitué SKINETHIC® de l'absence de toxicité d'une préparation cosmétique contenant un lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine :

- 35 L'épiderme reconstitué SKINETHIC® est un modèle d'épiderme humain développé et commercialisé par la Société SkinEthic Laboratories (Nice, France).

1- Sur épiderme reconstitué SKINETHIC® simple (constitué uniquement de kératinocytes):

Des kératinocytes d'origine humaine sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,63 cm<sup>2</sup> dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les deux jours.

Les épidermes ainsi formés ont été utilisés pour la réalisation de l'étude à partir du 17ème jour de culture.

Un essai préliminaire a été effectué afin de déterminer le temps de contact et la quantité de produit appliqué sur l'épiderme reconstitué n'entraînant pas de cytotoxicité.

Tous les tests ont été conduits en duplicate avec :

- Lot 1 : épidermes témoins ne recevant pas de produit
  - Lot 2 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,1% AK205
  - Lot 3 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,5% AK205
  - Lot 4 : épidermes traités recevant le produit lyophilisat de cellules(AK 205)
- AK205 = lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine obtenu selon les Exemples 1 et 2.  
PXTS = pour peaux très sèches

Les épidermes fixés dans une solution formaldéhyde 10% ont été inclus dans des blocs en paraffine. Les coupes verticales de 4 microns ont été colorées à l'hématoxyline/éosine et photographiées sous un microscope optique.

Les cultures doivent présenter des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, et la stratification épidermique doit être régulière et normale. Les cellules de la couche basale doivent être polarisées verticalement. De nombreux grains de kératohyaline doivent être visibles (en violet) dans la couche granuleuse juste sous la couche cornée.

Les produits, crème PXTS+0,1% AK205, crème PXTS+0,5% AK205 et le produit lyophilisat de cellules de Criste Marine

(AK 205) déposés à raison de 2  $\mu$ L par  $\text{cm}^2$ , sur des épidermes reconstitués traités pendant 24 heures, comparativement à des épidermes témoins, n'ont induit aucune toxicité. Les images histologiques, après coloration hématoxyline/éosine, d'épidermes traités sont comparables à celles des épidermes témoins (cf. Figure 1).

2- Sur épiderme reconstitué SKINETHIC® intégrant des mélanocytes :

Des kératinocytes d'origine humaine et des mélanocytes sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,63  $\text{cm}^2$  dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont cultivées pendant 10 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les jours.

Les épidermes de type VI (= négroïde) ainsi formés ont été utilisés à partir du 10ème jour de culture.

Un essai préliminaire a été effectué afin de déterminer le temps de contact et la quantité de produit appliqué sur l'épiderme reconstitué n'entraînant pas de cytotoxicité.

L'essai a été conduit en duplicate avec :

Lot 1 : épidermes témoins ne recevant pas de produit  
Lot 2 : épidermes témoins positifs recevant l'acide kojique, 2%

Lot 3 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,1% AK205  
Lot 4 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,5% AK205  
AK205 = lyophilisat de cellules différenciées de Criste Marine obtenu selon les Exemples 1 et 2.

Les épidermes fixés dans une solution formaldéhyde 10% ont été inclus dans des blocs en paraffine. Les coupes verticales de 4 microns ont été colorées à l'hématoxyline/éosine et photographiées sous un microscope optique.

Les cultures doivent présenter des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, et la stratification épidermique doit être régulière et normale. Les cellules de la couche basale



doivent être polarisées verticalement. De nombreux grains de kératohyaline doivent être visibles (en violet) dans la couche granuleuse juste sous la couche cornée.

- 5 Les produits, crème PXTS+0,1% AK205 et crème PXTS+0,5% AK205 déposés à raison de 2  $\mu$ L par cm<sup>2</sup>, sur des épidermes reconstitués traités pendant 24 heures, comparativement à des épidermes témoins, n'ont induit aucune toxicité. Les images histologiques, après coloration hématoxyline/éosine, 10 d'épidermes traités sont comparables à celles des épidermes témoins (cf. Figure 2).

Exemple 4 : Evaluation de l'effet dépigmentant d'une préparation cosmétique contenant un lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine sur des épidermes reconstitués SKINETHIC® intégrant des mélanocytes :  
15 1- Protocole expérimental

Des kératinocytes d'origine humaine et des mélanocytes sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,63 cm<sup>2</sup> dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les 20 cellules sont cultivées pendant 10 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les jours.

Les épidermes de type VI (= négroïde) ainsi formés ont 25 été utilisés à partir du 10ème jour de culture.

Tous les tests ont été conduits en duplicate avec :

- Lot 1 : épidermes témoins ne recevant pas de produit  
Lot 2 : épidermes témoins positifs recevant l'acide kojique, 30 2%  
Lot 3 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,1% AK205  
Lot 4 : épidermes traités recevant crème PXTS + 0,5% AK205  
AK205 = lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine obtenu selon les Exemples 1 et 2.

35

L'évaluation de la synthèse de la mélanine (étude qualitative) intracellulaire a été effectuée par spectrométrie à 475 nm après que les cellules ont été mises

en suspension puis dissoutes dans du NaOH (1N) et du diméthyl sulfoxyde pendant 30 minutes.

5 A la fin de la période d'incubation, le milieu de culture a été prélevé puis les épidermes ont été rincés avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et mis au contact du Triton X-100 (Sigma, France) à 1% puis incubés pendant 10 minutes. La réaction enzymatique a été initiée par l'ajout de la L-Dopamine (Sigma, France) à 10 mM dans du PBS dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$ .

10 Après 1 heure d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière, l'activité de la tyrosinase a été évaluée par la mesure de l'absorption à 475 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## 15 2- Résultats

### a) Dosage de la mélanine

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau :

	Absorbance (475 nm)	%
Témoin négatif	$0,160 \pm 0,02$	-
Témoin positif	$0,09 \pm 0,01$	-44
CREME PXTS+0,1% AK205	$0,139 \pm 0,02$	-13
CREME PXTS+0,5% AK205	$0,101 \pm 0,01$	-37

20 Les résultats obtenus ont révélé que la crème PXTS+0,5% AK205 a entraîné une diminution significative du taux de mélanine au niveau des épidermes reconstitués intégrant des mélanocytes (-37%). La crème PXTS+0,1% AK205 a réduit légèrement ce taux (-13%) comparativement au témoin positif  
25 acide kojique 2% (-44%).

### b) Evaluation de l'activité tyrosinasique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau :

	Absorbance (475 nm)	%
Témoin négatif	0,245 ± 0,03	-
Témoin positif	0,153 ± 0,01	-38
CREME PXTS+0,1% AK205	0,198 ± 0,02	-19
CREME PXTS+0,5% AK205	0,167 ± 0,02	-32

Les résultats obtenus ont révélé que le produit crème  
 5 PXTS+0,5% AK205 a entraîné une diminution significative de  
 l'activité de la tyrosinase au niveau des épidermes  
 reconstitués intégrant des mélanocytes (-32%)  
 comparativement au témoin positif (-38%). Une légère  
 diminution (-19%) après traitement par le produit crème  
 10 PXTS+0,1% AK205 a été observée.

En conclusion, dans les conditions expérimentales  
 retenues le produit crème PXTS+0,5% AK205 a présenté une  
 activité dépigmentante nette vis à vis des épidermes  
 15 reconstituants intégrant des mélanocytes. Une activité plus  
 limitée mais réelle a été observée avec la crème PXTS+0,1%  
 AK205.

Exemple 5 : Mise en évidence sur épiderme reconstitué  
 20 SKINETHIC® de l'effet anti-radicalaire d'une préparation  
cosmétique contenant un lyophilisat de cellules  
dédiérenciées de Criste Marine :

1- Pourquoi doser le malondialdéhyde?

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène moléculaire  
 25 est stable et peu réactif. Il se comporte comme un accepteur  
 d'électrons et sa réduction aboutit à la production d'eau.  
 Mais la réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> aboutit à la production  
 de radicaux libres et de métabolites tels que l'anion  
 superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le radical perhydroxyde HO<sub>2</sub><sup>-</sup> toxique (en  
 30 présence de fer ferreux, la réaction peut conduire à OH<sup>-</sup>,  
 très agressif) ou le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La superoxyde dismutase (SOD) protège les membranes en  
dismutant très rapidement  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . L' $H_2O_2$ , relativement  
stable, est réduit en eau ( $H_2O$ ) par la catalase et la  
peroxydase. Ces radicaux libres issus de la réduction  
5 incomplète de l' $O_2$  sont sensibles au niveau des doubles  
liaisons, ce qui favorise l'apparition d'autres radicaux  
libres par délocalisation électronique. L'initiation de la  
réaction en chaîne radicalaire se produit au niveau des  
acides gras polyinsaturés. La réaction en chaîne se  
10 déclenche alors, à l'intérieur de la membrane cellulaire  
conduisant à la libération du malondialdéhyde (MDA) ainsi  
que d'autres aldéhydes et alcanes qui sont des produits de  
dégradation. Ces derniers peuvent être mis en évidence par  
réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA).

15 En dosant le MDA, qui est l'un des marqueurs essentiels  
de la cytotoxicité par les processus oxydatifs et le stress,  
on dispose alors d'un indice qui renseigne sur l'activité  
antiradicalaire d'une substance donnée.

## 20 2- Protocole expérimental :

Des kératinocytes d'origine humaine sont ensemencés sur  
des filtres en polycarbonate de  $0,63\text{ cm}^2$  dans un milieu  
défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont  
cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide, le  
25 milieu de culture étant changé tous les deux jours.

Les épidermes ainsi formés ont été utilisés pour la  
réalisation de l'étude à partir du 17ème jour de culture.

L'essai a été conduit en triplicate après 24 h de  
30 contact du produit avec les épidermes:

- Lot 1 : épidermes témoins négatifs ne recevant aucun  
produit.
- Lot 2 : épidermes traités recevant le produit crème  
PXTS+0,1% AK205
- 35 -Lot 3 : épidermes traités recevant le produit crème  
PXTS+0,5% AK205
- Lot 4 : épidermes traités recevant le produit lyophilisat  
de cellules (Criste Marine)

Les produits à étudier ont été appliqués à la surface de chaque épiderme traité, à raison de 2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

=> Extraction du malondialdéhyde

Après 24h de contact du produit avec les épidermes, ces  
5 derniers ont été remis en suspension dans:

-250  $\mu\text{L}$  de tampon Tris 50 mM, pH 8 contenant NaCl 0,1 M ;  
EDTA 20 mM

-25  $\mu\text{L}$  de SDS à 7%

-300  $\mu\text{L}$  de HCl (0,1 N)

10 -38  $\mu\text{L}$  d'acide phosphotungstique à 1% dans l'eau

-300  $\mu\text{L}$  d'acide thiobarbiturique à 0,67% dans l'eau

Après 1 heure d'incubation dans l'obscurité à 50°C et  
un refroidissement dans l'eau glacée, 300 ml de n-butanol  
ont été ajoutés dans chaque tube. Ceux-ci ont été  
15 centrifugés à 10 000 g à 0°C pendant 10 min. La phase  
supérieure a été récupérée pour le dosage du MDA.

=> Dosage du malondialdéhyde

Le MDA a été dosé par mesure de la fluorescence après  
20 séparation du complexe MDA-TBA par HPLC (Chromatographie  
Liquide Haute Pression).

-Pompe Bischoff Model 2.200

-Injecteur automatique Alcot Model 788 autosampler

-Colonne Ultrasep C18 (30 cm x 0,18 cm) 6 mm de porosité

25 -Détecteur de fluorescence, jasco 821-FI

La détection de la fluorescence a été effectuée avec  
une excitation à 515 nm et une émission à 553 nm. L'éluant  
utilisé est composé de méthanol:eau, 40:60 (v/v) dont le pH  
30 a été ajusté avec du KOH 1 M.

La quantification a été faite par rapport à des  
standards traités comme les échantillons (0,125 ; 0,25 ; 0,5  
et 1 mM) à l'aide d'un logiciel informatique ICS (Pic 3)  
(Instrumentation, Consommable Service).

35

=> Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de  
BRADFORD. L'augmentation de l'absorbance à 595 nm est

proportionnelle à la concentration des protéines déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre UNI CAM 8625.

### 3- Résultats

#### 5 a) Lipoperoxydation physiologique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau :

	MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)	%
Témoin	$652 \pm 31$	-
CREME PXTS+0,1% AK205	$638 \pm 47$	-2 (ns)
CREME PXTS+0,5% AK205	$620 \pm 32$	-5 (ns)
LYOPHILISAT DE CELLULES	$594 \pm 57$	-9 (ns)

ns : non significatif

- 10 Les résultats montrent que les produits étudiés n'induisent aucune libération du MDA dans les conditions physiologiques, par rapport au témoin non traité.

#### b) Lipoperoxydation provoquée par des UVB

- 15 Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau :

	MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)	%
Témoin	$652 \pm 31$	
UVB (150 mJ/cm <sup>2</sup> )	$832 \pm 63$	+28*
CREME PXTS+0,1% AK205 + UVB (150 mJ/cm <sup>2</sup> )	$660 \pm 51$	-21**
CREME PXTS+0,5% AK205 + UVB (150 mJ/cm <sup>2</sup> )	$625 \pm 42$	-25**
LYOPHILISAT DE CELLULES + UVB (150 mJ/cm <sup>2</sup> )	$602 \pm 37$	-28**

\* par rapport au témoin négatif

\*\* par rapport au témoin positif irradié UVB

- 20 Les résultats obtenus ont révélé une protection significative des produits, crème PXTS+0,1% AK205, crème PXTS+0,5% AK205 et lyophilisat de cellules (Criste Marine), appliqués à la surface de l'épiderme reconstitué SKINETHIC®,

vis-à-vis de la lipoperoxydation provoquée par les rayons ultraviolets B (150 mJ/cm<sup>2</sup>).

Le pourcentage de réduction de la production de MDA est de -21, -25 et -28% respectivement pour crème PXTS+0,1% AK205, crème PXTS+0,5% AK205 et le produit lyophilisat de cellules (Criste Marine) en comparaison avec les épidermes irradiés.

L'irradiation UVB (témoin positif) ayant provoqué +28% d'augmentation de la production de MDA, l'application des produits crème PXTS+0,1% AK205, crème PXTS+0,5% AK205 et produit lyophilisat de cellules (Criste Marine) avant l'irradiation a permis de maintenir la production de MDA à son niveau physiologique.

Exemple 6 : Mise en évidence sur épiderme reconstitué SKINETHIC® de l'effet stimulant d'une préparation cosmétique contenant un lyophilisat de cellules dédifférenciées de Criste Marine :

1- Critères d'évaluation de la stimulation

La culture cellulaire des kératinocytes humains a permis de décrire plus en détails les effets spécifiques des dérivés de la vitamine A sur les marqueurs de la différenciation graduée de l'épiderme : l'expression de KI-67 dans la couche supra-basale est stimulée, l'expression de kératines typiques de l'hyperprolifération épidermique (K19, K13) est induite, il y a perte de la polarité des cellules de la couche basale, tandis que la synthèse de la filaggrine, protéine responsable de l'emballage des kératines dans la couche cornée, est inhibée. Les grains de kératohyaline, situés dans la couche granuleuse et riches en filaggrine, disparaissent en 24h en présence d'acide rétinoïque, 0,05% (acide de la vitamine A) dans le milieu de culture. Les rétinoïdes induisent donc globalement une stimulation de la prolifération et une inhibition de la différenciation épidermiques. (Rosdy, M. et al., In Vitro Toxicology, Vol.10 n°1, p. 39-47, 1997, "Retinoic acid inhibits epidermal differentiation when applied topically on the stratum corneum of epidermis formed in vitro by human

keratinocytes grown on defined medium")

La filaggrine et la protéine KI-67 peuvent donc être utilisés comme marqueurs de la différenciation épidermique.

5    2- Etude de la différenciation épidermique :

• Protocole

Des kératinocytes d'origine humaine sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,63 cm<sup>2</sup> dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont  
10 cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les deux jours.

Les épidermes ainsi formés ont été utilisés pour la réalisation de l'étude à partir du 17ème jour de culture.

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de  
15 contact des produits avec les épidermes :

-Lot 1 : épidermes témoins négatifs ne recevant aucun produit.

-Lot 2 : épidermes traités recevant le produit crème  
PXTS+0,1% AK205

20 -Lot 3 : épidermes traités recevant le produit crème  
PXTS+0,5% AK205

-Lot 4 : épidermes traités recevant le produit lyophilisat de cellules (Criste Marine)

25 Les épidermes témoins ne recevant aucun produit et les épidermes traités recevant les produits à l'étude pendant 24 heures de contact, ont été congelés à -80°C. Après inclusion en blocs de paraffine, ces épidermes ont été coupés puis traités en immunohistochimie.

30 Cette réaction a été réalisée avec un anticorps monoclonal recombinant de la filaggrine.

• Résultats : inhibition de la différenciation des cellules épidermiques

35 L'observation comparative des épidermes reconstitués témoins et traités avec les produits, crème PXTS+0,1% AK205, crème PXTS+0,5% AK205 et lyophilisat de cellules (Criste Marine), a révélé une différence de densité de marquage de



la filaggrine au niveau de la couche granuleuse (cf. Figure 3).

En effet, dans les conditions physiologiques, le traitement des épidermes par:

- 5 -crème PXTS+0,1% AK205: a induit une nette diminution de la différenciation épidermique se traduisant par la nette diminution du marquage de la filaggrine en comparaison avec les témoins non traités,
- 10 -crème PXTS+0,5% AK205: a induit une nette diminution de la différenciation épidermique se traduisant par la nette diminution du marquage de la filaggrine en comparaison avec les témoins non traités,
- 15 -lyophilisat de cellules (Criste Marine): a induit une diminution significative de la différenciation épidermique se traduisant par la nette diminution du marquage de la filaggrine en comparaison avec le témoin non traité.

### 3- Etude de l'activité prolifératrice des cellules de la couche basale des épidermes

#### 20 • Protocole

Des kératinocytes d'origine humaine sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,63 cm<sup>2</sup> dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les deux jours.

Les épidermes ainsi formés ont été utilisés pour la réalisation de l'étude à partir du 17ème jour de culture.

L'activité des produits a été révélée par un marquage immunohistochimique.

30 L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de contact du produit avec les épidermes :

- Lot 1 : épidermes témoins négatifs ne recevant aucun produit.
- Lot 2 : épidermes traités recevant le produit crème PXTS+0,1% AK205)
- 35 -Lot 3 : épidermes traités recevant le produit crème PXTS+0,5% AK205
- Lot 4 : épidermes traités recevant le produit lyophilisat

de cellules (Criste Marine)

Les épidermes témoins ne recevant aucun produit et les épidermes traités recevant les produits à l'étude pendant 24 heures de contact, ont été fixés dans le formaldéhyde 10%.  
5 Après inclusion en blocs de paraffine, ces épidermes ont été coupés puis traités en immunohistochimie.

Cette réaction a été réalisée avec l'anticorps MIB1 (Immunotech), peptide recombinant de l'antigène nucléaire KI-67.

10 La révélation a été faite par la méthode peroxydase-antiperoxydase après démasquage antigénique par pré-traitement à la chaleur.

Le marquage par chromogène DAB révèle en brun les sites nucléaires KI-67 de la fraction des cellules en croissance  
15 exprimée en phases:

=> G1 et S = phases de latence et de synthèse de la cellule  
=> G2 = phase de dédoublement des constituants cellulaires  
=> M = mitose

20 L'index mitotique a été évalué par comptage des sites nucléaires colorés, à raison de 10 champs par lame au microscope optique, grossissement x 250, comparativement aux coupes d'épiderme témoins.

• Résultats : stimulation de la prolifération des  
25 cellules épidermiques

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau :

	Moyenne du nombre de noyaux colorés par champ de comptage au microscope
Témoin	7 ± 2
CREME PXTS+0,1% AK205	8 ± 2
CREME PXTS+0,5% AK205	12 ± 2
LYOPHILISAT DE CELLULES	14 ± 3

30 Le comptage des sites nucléaires colorés au brun de tous les échantillons, après traitement immunohistochimique, a révélé que le produit:

-crème PXTS+0,1% AK205 : a entraîné une faible augmentation

mais significative de la multiplication des cellules de la couche basale. Le nombre de sites nucléaires colorés est comparable a celui des témoins non traités (cf. Figure 4).

5 -crème PXTS+0,5% AK205 : a entraîné une faible augmentation mais significative de la multiplication des cellules de la couche basale en comparaison avec le témoin non traité. Le nombre de sites nucléaires colorés est supérieur a celui des témoins non traités (cf. Figure 4).

10 -lyophilisat de cellules (Criste Marine): a entraîné une augmentation significative de la multiplication des cellules de la couche basale en comparaison avec le témoin non traité. Le nombre de sites nucléaires colorés est largement supérieur a celui des témoins non traités (cf. Figure 4)..

## REVENDICATIONS

1- Utilisation dans une composition cosmétique ou pharmaceutique d'au moins un lyophilisat de cellules végétales dédifférenciées, ledit lyophilisat permettant de dépigmenter et/ou éclaircir, de protéger et de régénérer  
5 l'épiderme.

2- Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que les cellules végétales dédifférenciées sont obtenues par culture in vitro.

3- Utilisation selon la revendication 2 caractérisée  
10 en ce que les cellules végétales dédifférenciées obtenues par culture in vitro sont des lignées.

4- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que les cellules végétales dédifférenciées sont des cellules de plantes  
15 halophiles.

5- Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que la plante halophile est la Criste Marine.

6- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le lyophilisat dépigmente et/ou éclaircit l'épiderme en bloquant l'activité  
20 de la tyrosinase.

7- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le lyophilisat protège l'épiderme par un effet anti-radicalaire.

8- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le lyophilisat régénère l'épiderme par un effet stimulant la prolifération des cellules de la couche basale de l'épiderme.  
25

9- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le lyophilisat régénère l'épiderme par un effet inhibant la différenciation épidermique.  
30

10- Composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans une base physiologiquement acceptable, au moins un lyophilisat tel  
35 que décrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

11- Composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans une base physiologiquement acceptable, de 0,05% à 2% d'au moins un lyophilisat tel que décrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

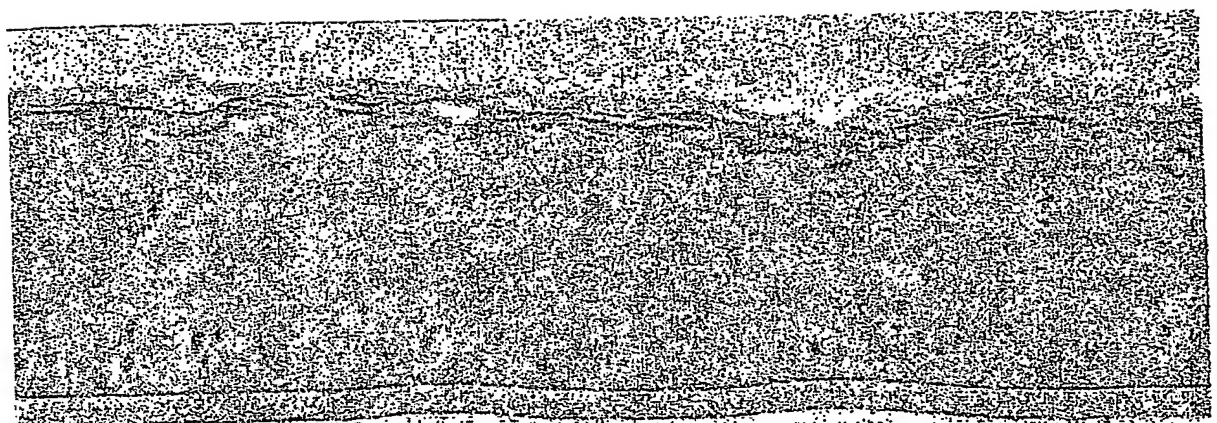
12- Composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans une base physiologiquement acceptable, de 0,1% à 1% d'au moins un lyophilisat tel que décrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

13- Composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans une base physiologiquement acceptable, 0,5% d'au moins un lyophilisat tel que décrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

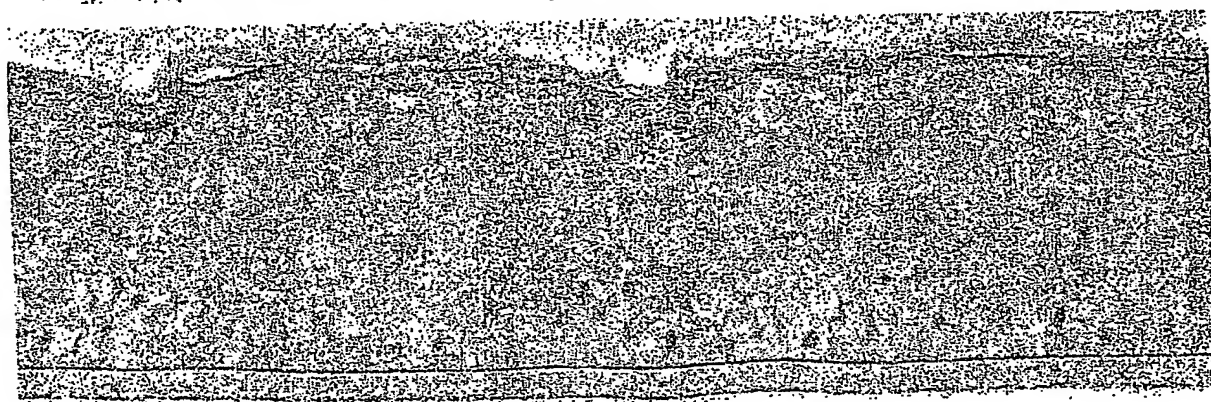
14- Composition selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, destinée à rajeunir l'aspect de la peau.

15- Composition selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, destinée au traitement des taches pigmentaires.

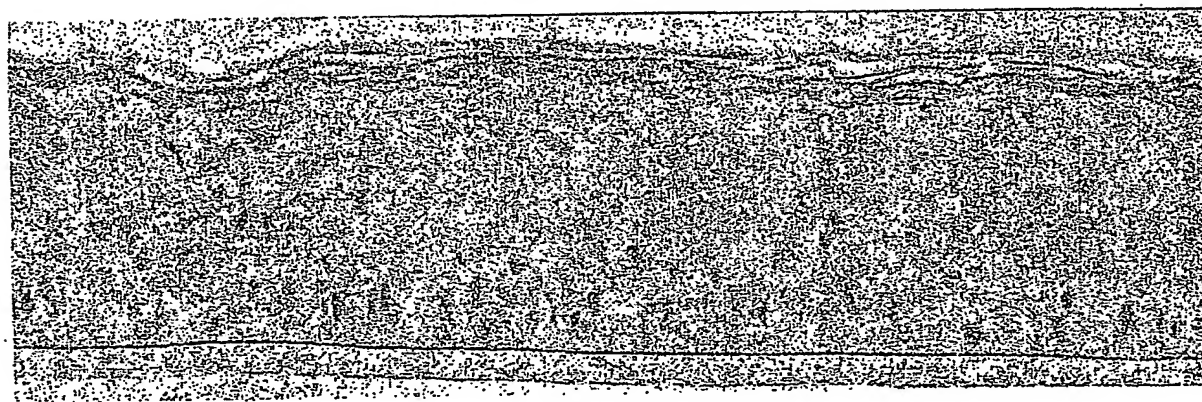
16- Composition selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, destinée à éclaircir les peaux noires ou asiatiques.



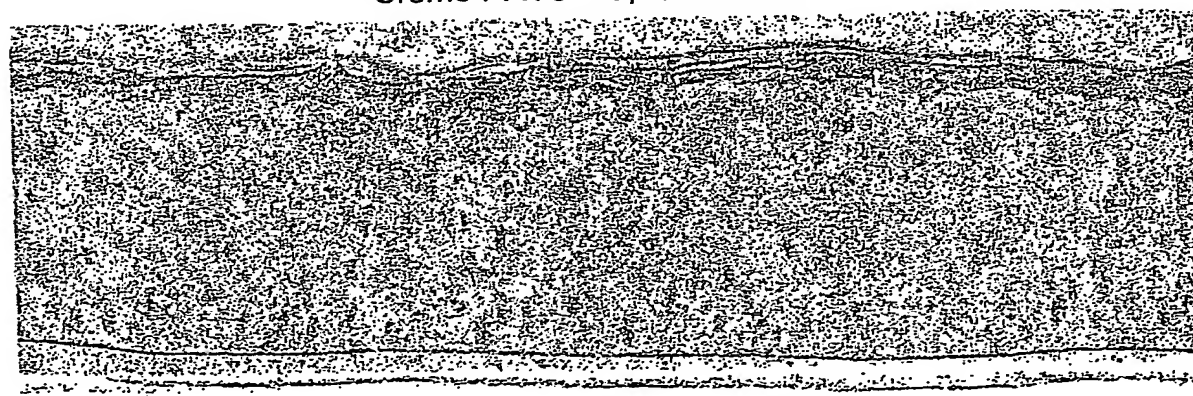
Témoin



Crème PXTS + 0.1% AK205



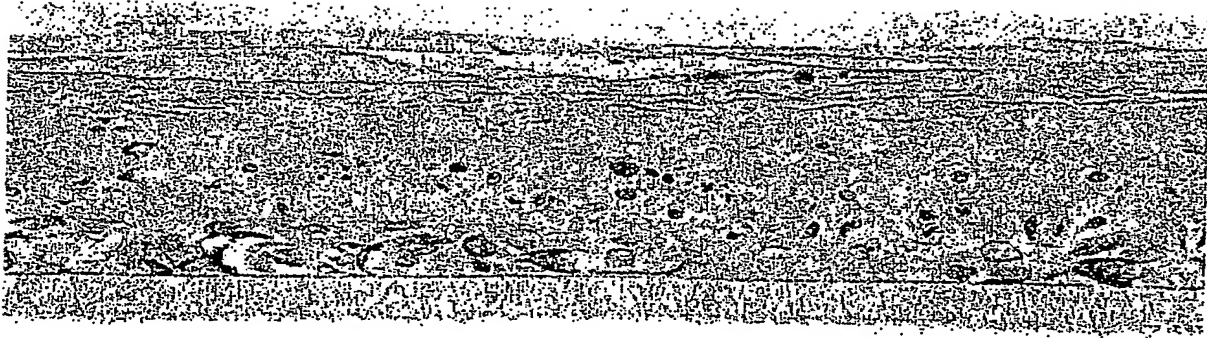
Crème PXTS + 0,5% AK205



Lyophilisat de cellules (Criste Marine)

Fig. 1

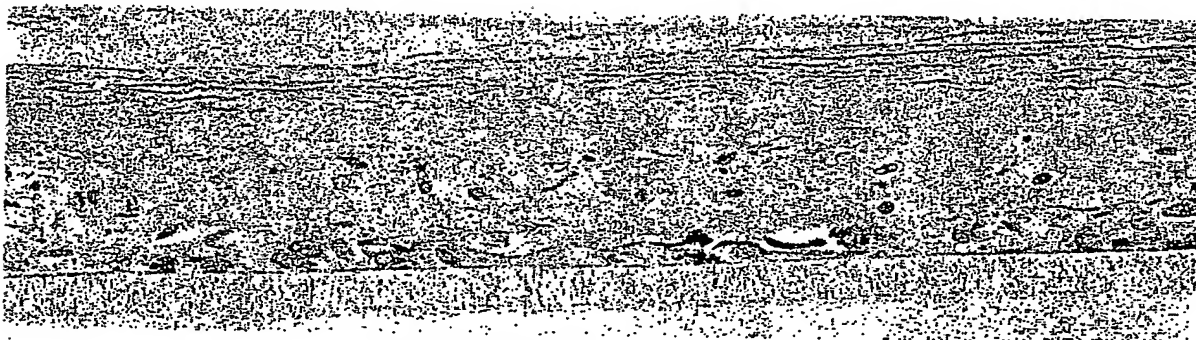




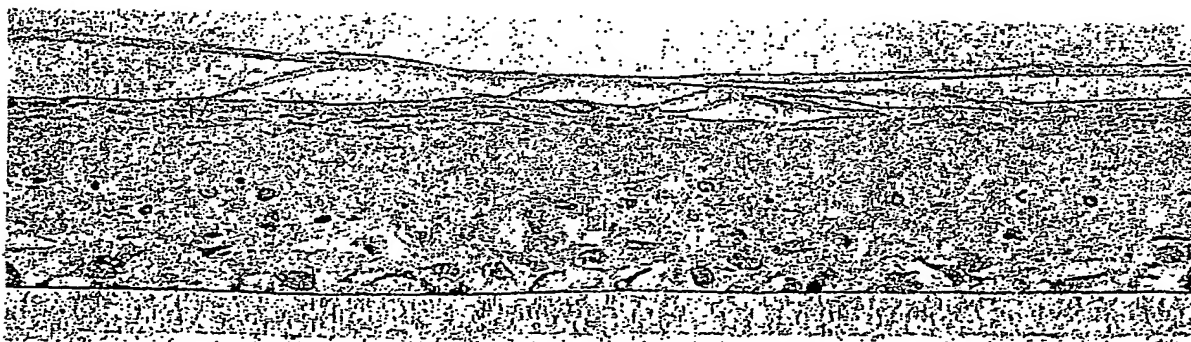
Témoin négatif



Témoin positif (acide kojique)

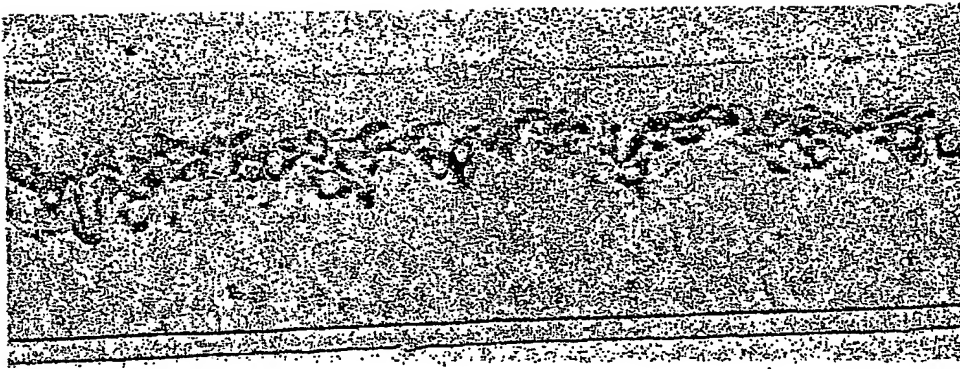


Crème PXTS + 0,1% AK205

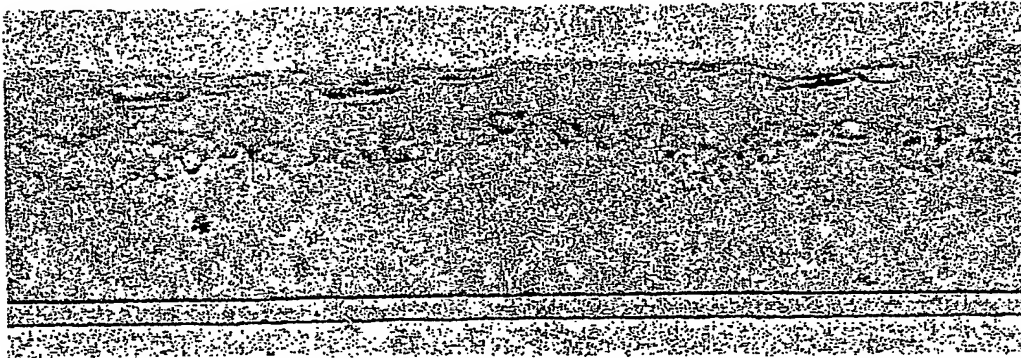


Crème PXTS + 0,5% AK205

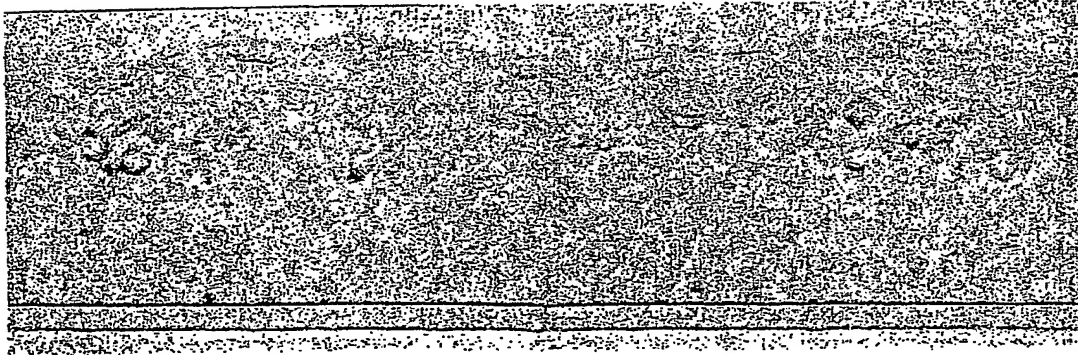
Fig. 2



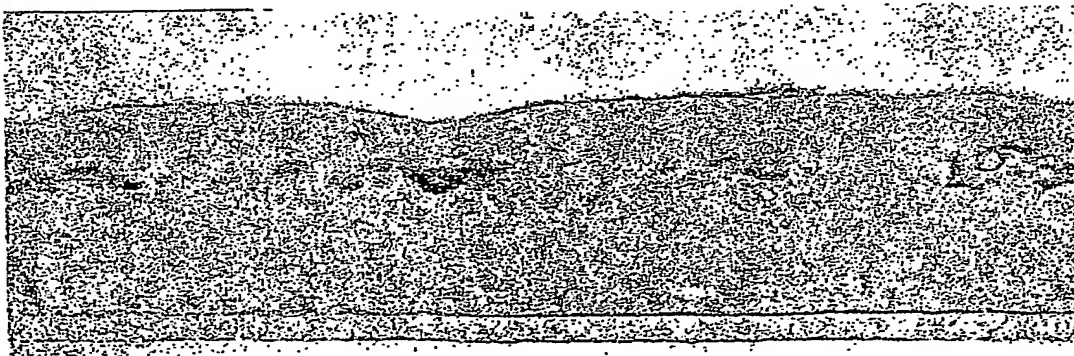
Témoin



Crème PXTS + 0,1% AK205



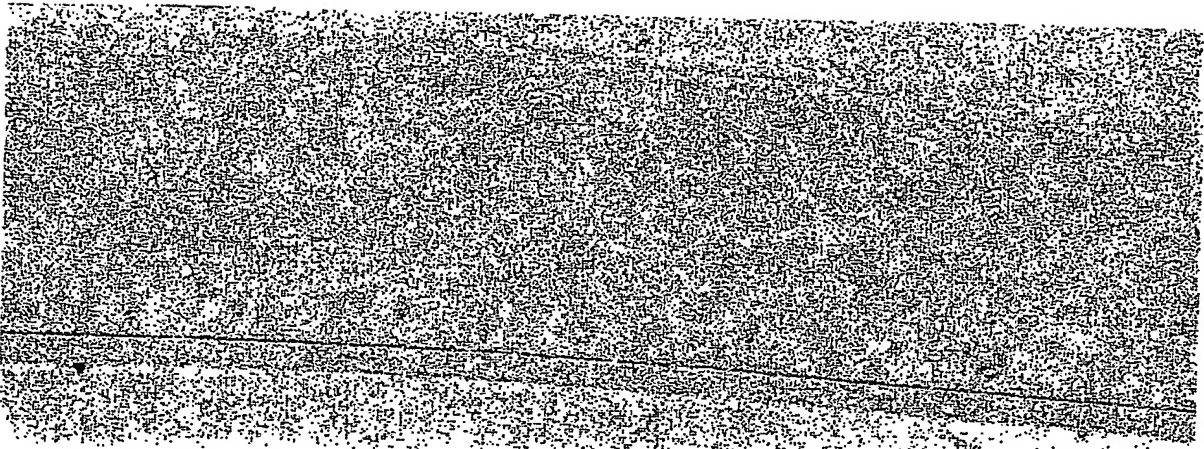
Crème PXTS + 0,5% AK205



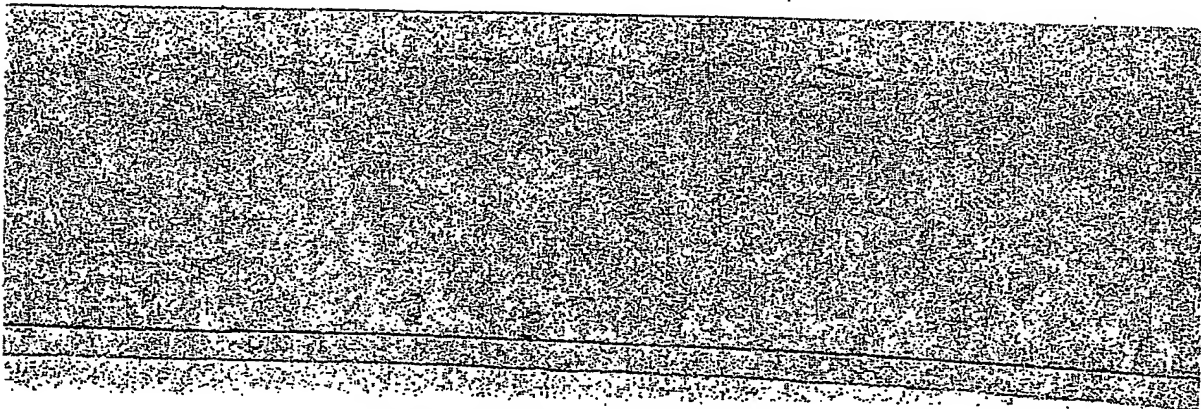
Lyophilisat de cellules (Criste Marine)

Fig. 3

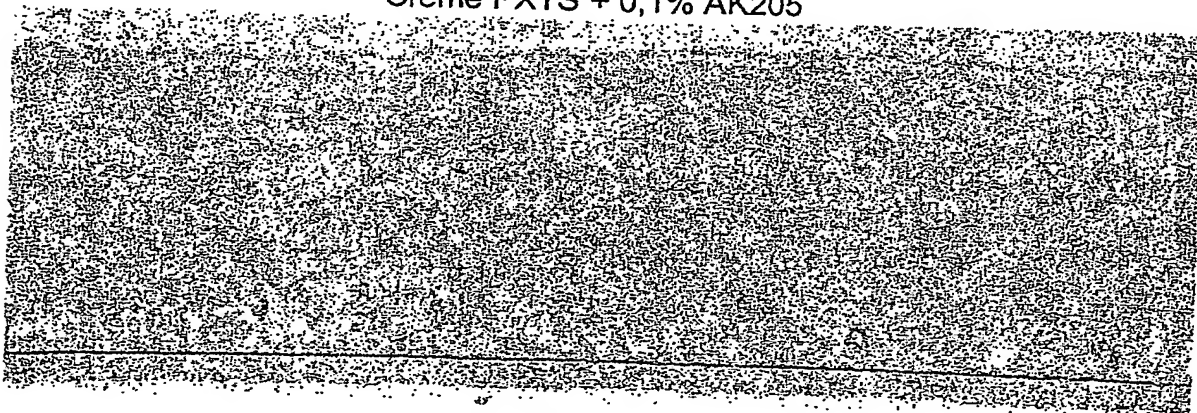




Témoin



Crème PXTS + 0,1% AK205



Crème PXTS + 0,5% AK205

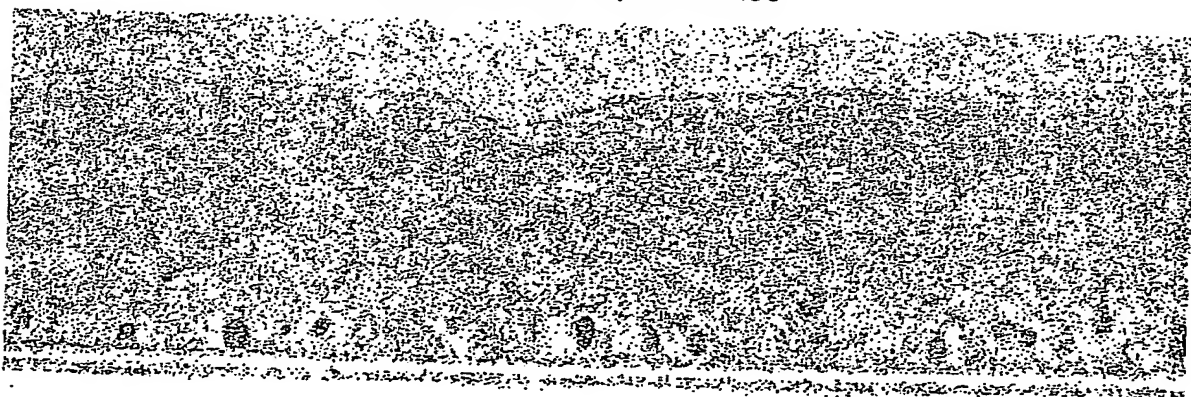


Fig. 4

Lyophilisat de cellules (Criste Marine)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

16 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270501

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>	SECMA 10019/3
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>	03 15521

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Utilisation dans une composition cosmétique ou pharmaceutique d'au moins un lyophilisat de cellules végétales différenciées afin de dépigmenter et/ou éclaircir, de protéger et de régénérer l'épiderme.

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

SOCIÉTÉ D'ENGRAIS COMPOSÉS MINÉRAUX ET AMÉNDEMENTS

ayant son social :

Zone Industrielle

PONTRIEUX

22260 PONTRIEUX

FRANCE

**DESIGNÉ(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

<b>1</b>	Nom	MEKIDECHE	
	Prénoms	Nicole	
	Adresse	Rue	Chemin du Huitel
		Code postal et ville	12 216 210 PLOUBAZLANEC - France
	Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom		
	Prénoms		
	Adresse	Rue	
		Code postal et ville	
	Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom		
	Prénoms		
	Adresse	Rue	
		Code postal et ville	
	Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**

**DU (DES) DEMANDEUR(S)**

**OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

Paris le 6 février 2004

CHUILLIER René - n° 92-1160

**ARMENGAUD Jeune**  
**CABINET LEPEUDRY**

43, rue de la Brèche aux loups  
75012 PARIS

PCT/FR2004/003109



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**